棉铃虫幼虫取食 Vip3Aa 蛋白后的中肠组织病理变化

张　彦，梁革梅*，张丽丽，魏纪珍
（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：为了进一步明确 Vip3Aa 的作用机制，利用透射电镜观察了棉铃虫 4 龄幼虫取食含 Vip3Aa 蛋白饲料后中肠杯状细胞的病理变化，并比较了其病变与取食含 Cry1Ac 饲料后棉铃虫组织病变的差异。取食含 Vip3Aa 饲料后，棉铃虫幼虫的中肠杯状细胞逐渐发生病变，主要表现为：微绒毛肿胀、脱落；细胞核核膜界限不清晰，染色质分布不均匀；线粒体变形、数量减少，内脊不清晰；内质网杂乱不规则、数量减少。与取食 Cry1Ac 的棉铃虫相比，取食 Vip3Aa 的棉铃虫中肠杯状细胞发生病变较为缓慢，在取食 12 h 后才发现明显病变，随着取食时间的增加病变越来越明显；而取食 Cry1Ac 的棉铃虫 2 h 后中肠杯状细胞就出现明显病变。本研究可为 Vip3Aa 作为新毒素策略的重要蛋白在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 综合防治中更好地发挥作用提供理论依据。

关键词：棉铃虫；Vip3Aa；Cry1Ac；中肠组织；病理变化
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)07-0869-08

Pathological changes in midgut tissues of larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), after feeding Vip3Aa protein

ZHANG Yan, LIANG Ge-Mei*, ZHANG Li-Li, WEI Ji-Zhen (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The pathological changes in midgut tissues of larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), fed on artificial diet containing Vip3Aa protein were observed using transmission electron microscope, and the changes induced by Cry1Ac were also investigated in order to ascertain the action mechanism of Vip3Aa. The results showed that the goblet cells changed gradually after *H. armigera* larvae fed on artificial diet containing Vip3Aa protein, and the major symptoms included: microvilli swelled and dropped off, the boundaries of karyotheca in cell nucleus blurred and the chromatins unevenly distributed, the numbers of mitochondria and endoplasmic reticulum reduced, the inner cristae of mitochondria blurred, and the endoplasmic reticulum mixed disorderly. The pathological changes of goblet cells in the midgut of *H. armigera* larvae induced by Vip3Aa were slower than that by Cry1Ac. The obvious pathological changes were detected at 12 h after feeding Vip3Aa, and the pathological changes became more and more evident with extension of feeding time. The obvious pathological changes of *H. armigera* induced by Cry1Ac, however, appeared at 2 h after Cry1Ac treatment. This study may enrich the theoretical basis for better using Vip3Aa as new toxin strategy in IPM of the cotton bollworm.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Vip3Aa; Cry1Ac; midgut tissues; pathological changes

转 Bt 基因棉花在中国的推广种植有效地控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)的危害(Wu *et al.*, 2008)，但随着转基因棉种植面积的逐年扩大，使得棉铃虫等靶标害虫在整个生长周期都面临杀虫蛋白的高压选择。因此，棉铃虫对 Bt 棉花的抗性已成为影响转基因棉花持续利用的关键因素(吴孔明, 2007; Tabashnik *et al.*, 2010)。为了有效地延缓抗性发展，人们提出了各种抗性治理策略，如双价转基因作物策略和新毒素策略等。

Vips 是伴孢晶体形成的过程中产生的一种营

基金项目：国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2011ZX08011-002)；国家自然科学基金项目(30971921)
作者简介：张彦，女，1985 年生，河北保定人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理生化与分子生物学，E-mail: yzhang0501@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gmliang@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2012-04-19；接受日期 Accepted: 2012-06-28

养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, Vips)(Schnepf *et al*., 1998)，对鳞翅目昆虫具有广谱的杀虫活性(Estruch *et al*., 1996; Fang *et al*., 2007)。由于 Vip3A 在进化上和 Cry 类杀虫晶体蛋白没有同源性，存在交互抗性的可能性很低(Lee *et al*., 2003, 2006)，作为害虫综合治理中的"新毒素策略"正在广泛应用，可以有效地延缓靶标害虫抗性发展。Vip3A 已经成功转入了转基因棉花中，作为一项抗性治理的新措施，已在澳大利亚等国家开始种植。如 Syngenta 公司研发的转双价产品 VipCot (Cry1Ab and Vip3A)(James, 2009)。

Lee 等(2003)报道，全长 88 kDa 的 Vip3A 类蛋白无法直接与上皮细胞结合，必须在中肠蛋白的酶解作用下形成 62 kDa 的核心片段才能发挥活性。他们提出 Vip3A 的作用机制为：Vip3A 蛋白被昆虫取食后在中肠液蛋白酶的作用下形成核心蛋白，与昆虫的中肠细胞结合，引起细胞膜的穿孔，细胞随后膨胀破裂，造成昆虫的生理生化代谢失调，昆虫停止进食，最终导致死亡。但具体关于 Vip3A 造成的中肠细胞组织病理学变化报道很少。

据报道 Cry 类蛋白造成的昆虫中肠组织病理变化主要包括：顶端微绒毛肿胀、内质网囊泡化、核糖体缺失、线粒体肿胀、细胞核肿胀，及随后的细胞核、细胞器和质膜破裂，最终细胞内含物随着细胞一起脱落释放入肠腔里(梁革梅等, 2001; Sutherland *et al*., 2003; Sousa *et al*., 2010)。本研究利用透射电镜观察了棉铃虫取食含 Vip3Aa 饲料后中肠杯状细胞的病理变化，并与取食含 Cry1Ac 饲料的棉铃虫进行了比较，为进一步明确 Vip3Aa 的作用机制及更好地发挥 Vip3Aa 作为新毒素策略重要蛋白在棉铃虫综合防治中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和菌株

棉铃虫敏感品系 96S 于 1996 年采自河南新乡，一直在室内用人工饲料饲喂，温度 26 ± 1℃，相对湿度 60% ~ 85%，光周期 16L: 8D，未接触任何 Bt 毒素蛋白和杀虫剂。人工饲料配方参见梁革梅和谭维嘉(1999)。

Cry1Ac 和 Vip3Aa 菌株均由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供；Cry1Ac 参照 Song 等(2003)方法由 HD-73 菌株提取得到，Vip3Aa 参照刘荣梅等(2004)方法利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 诱导表达获得。

1.2 中肠杯状细胞的电镜观察

将 4 龄敏感品系棉铃虫幼虫饥饿 24 h 后，分别饲喂含 50 μg/g Vip3Aa 蛋白或 0.5 μg/g Cry1Ac 蛋白的人工饲料；以饲喂正常人工饲料的幼虫为对照。每个处理 24 头。在取食 2, 4 , 8, 12, 24 和 48 h 后分别切取幼虫中肠，用 2% 戊二醛前固定中肠样品，用 1% 锇酸进行后固定。

取常温保存的经戊二醛前固定的棉铃虫中肠样品，用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗 2 h，中间更换 4 次缓冲液；再用锇酸后固定，用缓冲液冲洗 15 s，中间更换 1 次缓冲液。固定好的样品用梯度乙醇溶液脱水，再用无水丙酮置换 3 次，然后 618#环氧树脂包埋，置于 37℃ 聚合 12 h、45℃ 聚合 12 h、60℃ 聚合 48 h。修组织块后，使用莱卡 UC6 型超薄切片机切片，切片厚度约 300 ~ 500 埃。用醋酸铀-柠檬酸铅进行双染色。利用日产 Hitachi-500 电子透射显微镜观察并拍照，加速电压为 80 kV。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫杯状细胞超微结构的变化

2.1.1 微绒毛：正常微绒毛数量众多，排列紧密、整齐；取食含 Vip3Aa 或 Cry1Ac 毒蛋白的饲料后，棉铃虫中肠细胞微绒毛肿胀变形、脱落(图 1)。

2.1.2 细胞核：正常细胞核形状饱满，染色质均匀，核膜完整；取食含毒蛋白的幼虫细胞核拉长变形，核膜界限不清晰，染色质分布不均匀(图 2)。

2.1.3 线粒体：正常线粒体为椭圆形，内脊清晰；喂过毒蛋白的棉铃虫线粒体拉长变形，数量减少，内脊不清晰(图 3)。

2.1.4 内质网：正常内质网排列整齐有序；饲喂过毒素的内质网杂乱不规则、肿胀，数量变少(图 4)。

2.2 不同毒蛋白对棉铃虫中肠杯状细胞的病理学影响

取食正常饲料的棉铃虫中肠杯状细胞表现正常，没有病理变化，细胞质均匀，细胞器丰富，柱状细胞顶端微绒毛数量众多，微绒毛排列紧密、整齐，其细胞膜完整，无明显变化。

取食 Vip3Aa 毒蛋白的棉铃虫中肠细胞的病变速度较慢，起初组织变化并不明显，在取食 12 h 后才能看到明显的破坏，48 h 后破坏比较严重，其中对微绒毛的破坏作用最大。

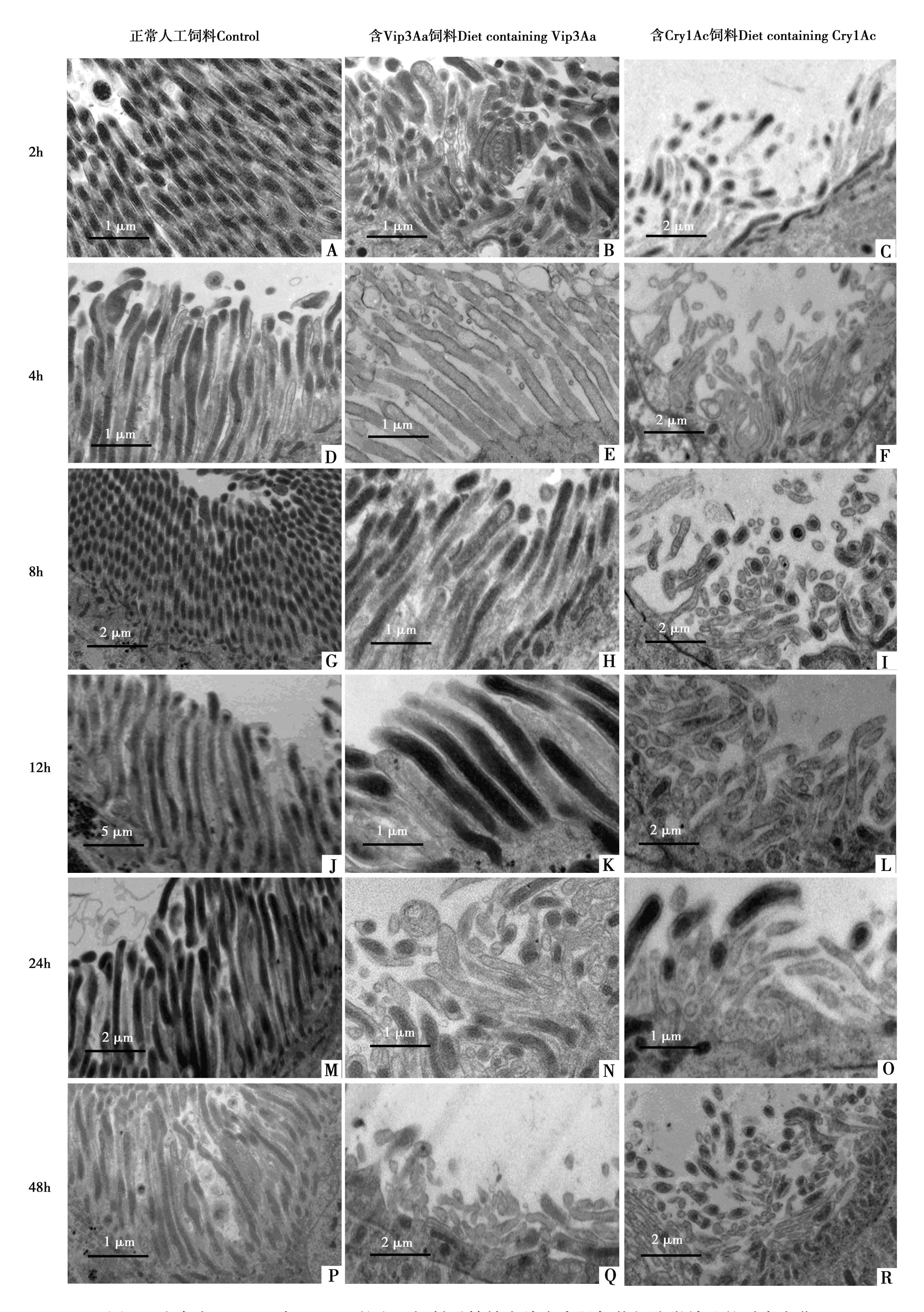


图 1　取食含 Vip3Aa 或 Cry1Ac 的人工饲料后棉铃虫幼虫中肠杯状细胞微绒毛的时序变化

Fig. 1　Change of the microvillus in midgut goblet cells of *Helicoverpa armigera* larvae feeding on different artificial diets with feeding time

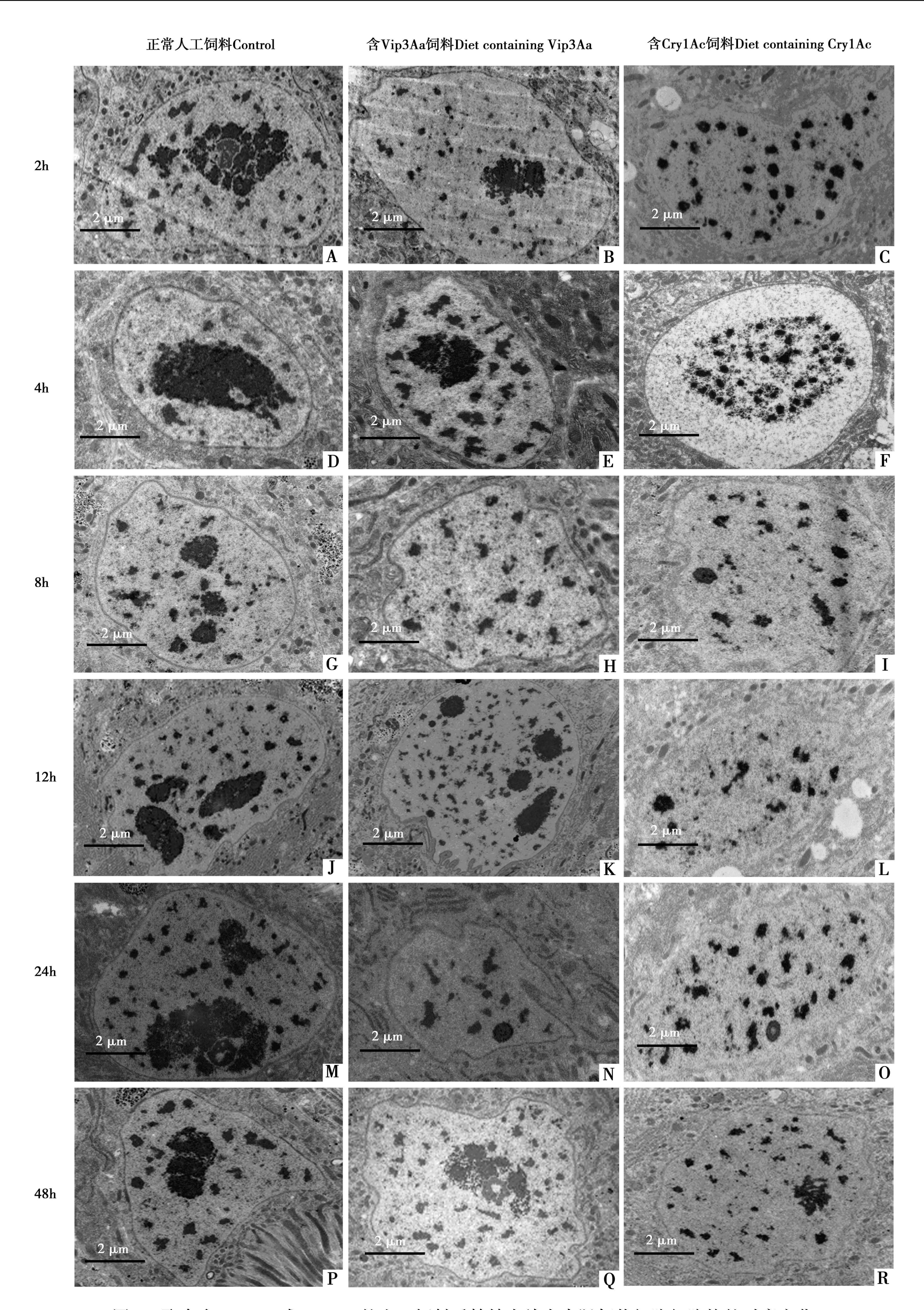


图2 取食含 Vip3Aa 或 Cry1Ac 的人工饲料后棉铃虫幼虫中肠杯状细胞细胞核的时序变化

Fig. 2 Change of the cell nucleus in midgut goblet cells of *Helicoverpa armigera* larvae feeding on different artificial diets with feeding time

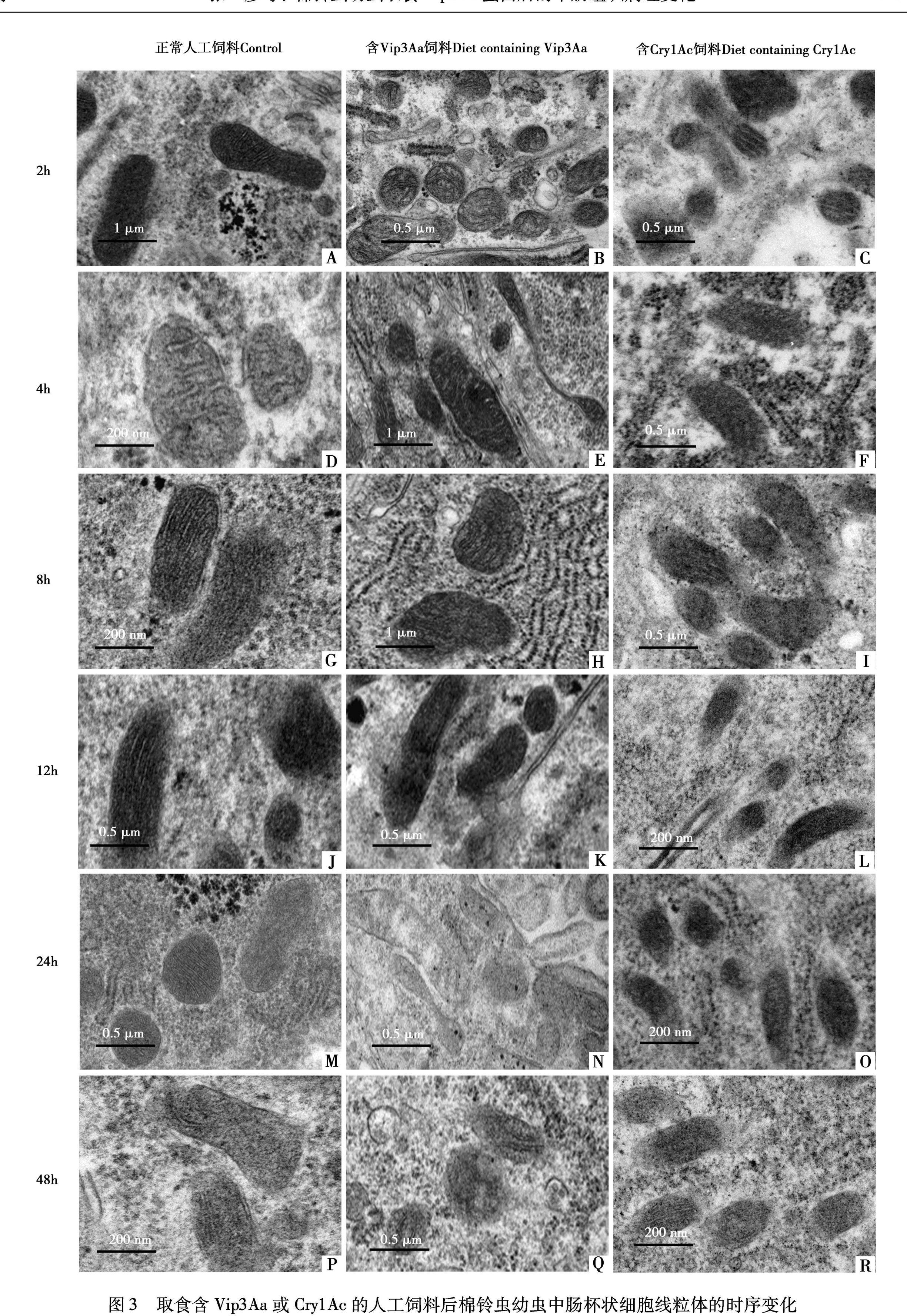


图 3　取食含 Vip3Aa 或 Cry1Ac 的人工饲料后棉铃虫幼虫中肠杯状细胞线粒体的时序变化

Fig. 3　Change of the mitochondria in midgut goblet cells of *Helicoverpa armigera* larvae feeding on different artificial diets with feeding time

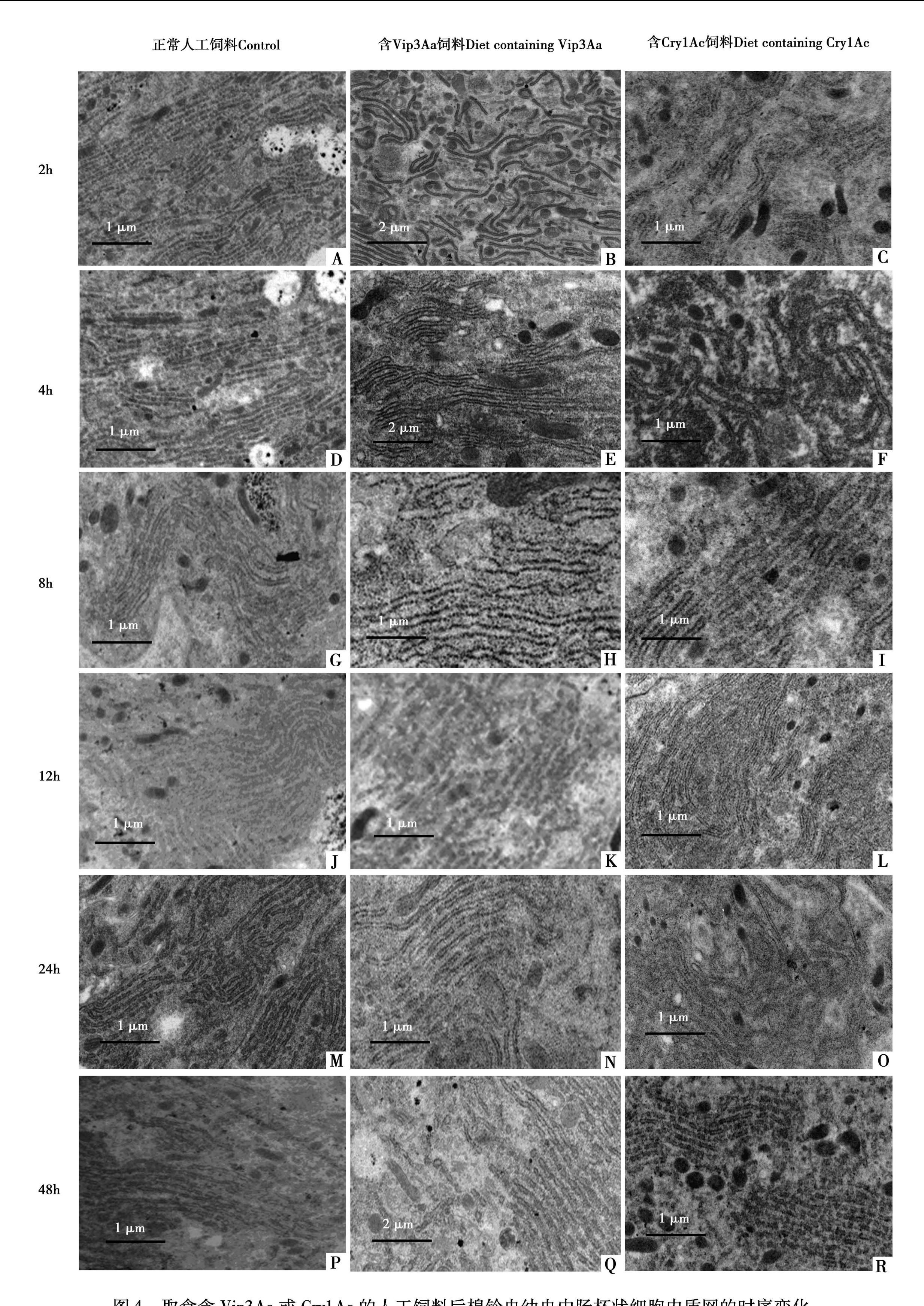


图 4 取食含 Vip3Aa 或 Cry1Ac 的人工饲料后棉铃虫幼虫中肠杯状细胞内质网的时序变化

Fig. 4 Change of the endoplasmic reticulum in midgut goblet cells of *Helicoverpa armigera* larvae feeding on different artificial diets with feeding time

而取食 Cry1Ac 毒蛋白的棉铃虫中肠细胞的病变速度比 Vip3Aa 快，在取食 2 h 后就出现明显的变化，随着取食时间的延长，病理变化越来越显著。首先表现为微绒毛肿胀，细胞核变形皱缩，线粒体拉长变形，内质网肿胀等现象；到 48 h 后微绒毛大部分脱落，细胞核染色质凝缩，核膜缺失严重，线粒体内脊不清晰，内质网断裂肿胀、数量减少。

3　讨论

由于 Vip3A 和 Cry 类蛋白存在交互抗性的可能性很低，因此作为一项抗性治理的新措施，Vip3A 已经成功地被转入了转基因棉花中，但是关于 Vip3A 的杀虫机制还不是很明确。Yu 等(1997)通过细胞组织病理学试验，发现小地老虎 *Agrotis ypsilon* 取食含有 Vip3A 蛋白的人工饲料 24 h 后，中肠上皮柱状细胞的末端膨大成球形，杯状细胞的形态稍有改变；取食 48 h 后，上皮柱状细胞破裂，细胞碎片充满内腔，杯状细胞也出现明显的损伤，但是两者都仍与基膜相连；72 h 后，中肠上皮层的细胞完全脱落，饲喂的幼虫死亡。本研究通过透射电镜观察了棉铃虫取食含 Vip3Aa 饲料后中肠细胞内部的具体变化，发现棉铃虫中肠的微绒毛、细胞核、线粒体、内质网等都发生了病理变化，而且随着取食时间的延长病变越来越明显，进一步明确了 Vip3Aa 的作用机理。

Estruch 等(1996)报道，Vip3A 类蛋白引起的昆虫中毒症状与 Cry 类杀虫晶体蛋白类似，但毒素蛋白对昆虫中肠细胞的作用时间延迟；杀虫晶体蛋白的作用时间大概在 16 ~ 24 h，作用比较迅速，而相同浓度的 Vip3A 活化的 62 kDa 蛋白在烟草天蛾 *Manduca sexta* 的中肠细胞上形成孔洞的时间是同浓度的 Cry1Ab 的 8 倍，这可能是 Vip3A 类蛋白的作用时间比杀虫晶体蛋白延缓的原因。本研究结果与报道的很相似，试验表明：棉铃虫取食含 Cry1Ac 饲料 2 h 后，中肠杯状细胞就出现明显病变；而取食含 Vip3Aa 的棉铃虫中肠细胞发生病变较为缓慢，在取食 12 h 后才发现明显病变。

关于 Vip3A 与中肠细胞的受体蛋白结合及交互抗性也有一些研究，如 Lee 等(2003, 2006)比较了 Vip3Aa 与 Cry1Ab 在烟草天蛾刷状缘膜囊泡(brush border membrane vesicles, BBMV)上的结合位点之间的差异，结果表明，Vip3Aa 并不能与 Cry1Ab 蛋白的受体氨肽酶(APN)类似物和钙粘蛋白类(Cadherin)结合，其结合蛋白的分子量在 80 kDa 和 100 kDa。美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 BBMV 与活化的 Vip3Aa 或 Cry1Ac 的蛋白结合和竞争结合实验也表明，两者不存在着相同的结合受体，没有存在交互抗性的可能(Lee *et al.*, 2003, 2006)。但是 Vip3Aa 在昆虫中肠确切的受体目前还不明确，有待进一步研究。

致谢　感谢中国农业科学院原子能研究所郝宏京老师对电镜切片、拍照等工作给予的指导与帮助。

参 考 文 献 (References)

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5389 – 5394.

Fang J, Xu XL, Wang P, Zhao JZ, Shelton AM, Cheng JA, Feng MG, Shen ZC, 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3): 956 – 961.

James C, 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY.

Lee MK, Miles P, Chen JS, 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339: 1043 – 1047.

Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4648 – 4657.

Liang GM, Tan WJ, 1999. An improvement in artificial rearing technique of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, (2): 15 – 17. [梁革梅, 谭维嘉, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, (2): 15 – 17]

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2001. Pathological changes in midgut tissues of cotton bollworm larvae after intaking transgenic Bt cotton. *Cotton Science*, 13(3): 138 – 141. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2001. 棉铃虫取食转 Bt 基因棉花中肠组织的病理变化. 棉花学报, 13(3): 138 – 141]

Liu RM, Zhang J, Gao JG, Song FP, 2004. The research on *vip3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. *High Technology Letters*, (9): 39 – 42. [刘荣梅, 张杰, 高继国, 宋福平, 2004. 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白基因 *vip3A* 的研究. 高技术通讯, (9): 39 – 42]

Schnepf E, Crickmore N, VanRie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol.*, 62(3): 775 – 806.

Song F, Zhang J, Gu A, Wu Y, Han LL, He KL, Chen ZY, Yao J, Hu YQ, Li GX, Huang DF, 2003. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5207 – 5211.

Sousa MEC, Santos FAB, Wanderley-Teixeira V, Teixeira ÁAC,

Siqueira HÁA, Alves LC, Torres JB, 2010. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1913–1919.

Sutherland PW, Harris MO, Markwick NP, 2003. Effects of starvation and the *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac on the midgut cells, feeding behavior, and growth of lightbrown apple moth larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96(3): 250–264.

Tabashnik BE, Carrière Y, 2010. Field-evolved resistance to Bt cotton: bollworm in the U. S. and pink bollworm in India. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 417–424.

Wu KM, 2007. Environmental impacts and risk management strategies of Bt cotton commercialization in China. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15(1): 1–4. [吴孔明, 2007. 我国 Bt 棉花商业化的环境影响与风险管理策略. 农业生物技术学报, 15(1): 1–4]

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with *Bt* toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.

Yu CG, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG, Estruch JJ, 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 532–536.

(责任编辑: 赵利辉)